



2877
A33331 PCT USA - 070180.0137 #9

PATENT *1.28*

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Applicant : Fuhr et al.

Serial No. : 09/582,609

Group Art Unit: 2877

Filed : June 28, 2000

For : PROCESSES AND DEVICES TO MEASURE,
CALIBRATE, AND USE LASER TWEEZERS

RECEIVED

MAR 23 2001

TECH CENTER 1600/2900

CLAIM FOR PRIORITY UNDER 35 U.S.C. § 119

Assistant Commissioner for Patents

Washington, D.C. 20231

Sir:

A claim for priority is hereby made under the provisions of 35 U.S.C. § 119 for the above-identified PCT application based upon German application 197 57 785.7 filed December 28, 1997, and International Application PCT/EP98/08370 filed December 21, 1998.

Respectfully submitted,

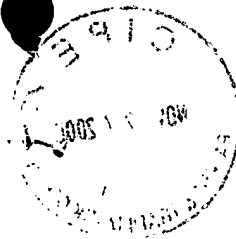
Ronald B. Hildreth
Patent Office Reg. No. 19,498

(212) 408-2544
Attorney for Applicant

Baker Botts L.L.P.

NY02:293665.1

RECEIVED
DEC 05 2000
TECHNOLOGY CENTER 2800



THIS PAGE BLANK (USPTO)

100

100-443887-100

GAU 2877

A33331 PCT USA - 070180.0137

PATENT

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Applicant : Fuhr et al.
Serial No. : 09/582,609 Group Art Unit: 2877
Filed : June 28, 2000
For PROCESSES AND DEVICES TO MEASURE,
CALIBRATE, AND USE LASER TWEEZERS

LETTER

I hereby certify that this paper is being deposited with the United States Postal Service as first class mail in an envelope addressed to: Commissioner of Patents and Trademarks, Washington, D.C. 20231

January 17, 2001
Date of Deposit

Ronald B. Hildreth
Attorney Name

19,498
PTO Reg. No.

Signature

January 17, 2001
Date of Signature

Assistant Commissioner for Patent

Washington, D.C. 20231

Sir:

As of September 29, 2000, the Assignee, EVOTEC BioSystems AG, of the above-identified application has merged and is no longer eligible for Small Entity Status.

Respectfully submitted,

Ronald B. Hildreth
Patent Office Reg. No. 19,498

(212) 408-2544
Attorney for Applicant

Baker Botts L.L.P.
30 Rockefeller Plaza
New York NY 10112

RECEIVED
JAN 24 2001
TC 2800 MAIL ROOM

RECEIVED
MAR 22 2001
TECH CENTER 1600/2900

THIS PAGE BLANK (USPTO)

RECEIVED
JAN 10 1984
FBI - NEW YORK

**PRIORITY
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



Bescheinigung



ESU

Herr Professor Dr. Günter F u h r in Berlin/Deutschland hat eine Patentanmeldung
unter der Bezeichnung

"Verfahren und Vorrichtung zur Vermessung und
Kalibrierung von Laser-Pinzetten"

am 28. Dezember 1997 beim Deutschen Patent- und Markenamt eingereicht.

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprüng-
lichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patent- und Markenamt vorläufig das Symbol
G 01 L 1/25 der Internationalen Patentklassifikation erhalten.

München, den 8. Januar 1999

Deutsches Patent- und Markenamt

Der Präsident

Im Auftrag

Aktenzeichen: 197 57 785.7

Nietiedt

11.17.09.99

Patentanmeldung von Prof. Dr. Günter Fuhr, Berliner Str. 28a, 13127 Berlin, 28. 12. 1997

Verfahren und Vorrichtung zur Vermessung und Kalibrierung von Laser-Pinzetten

Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren und eine Vorrichtung zur quantitativen Vermessung optisch induzierter Kräfte auf Teilchen in optischen Käfigen. Hierzu wird ein elektrischer Hochfrequenzfeldkäfig, gebildet durch eine Gruppe von Mikroelektroden (11 bis 18), mit einem fokussierten Lichtstrahl (19) so kombiniert, daß sich der Fokus (110a) innerhalb des Feldkäfigraumes (111) befindet. Das Verfahren beruht darauf, ein Teilchen (113) in einem Laserstrahl zu fangen und in eine Position (z.B. 114, Koordinaten (x_1, y_1, z_1)), mit Abstand zum Fangpunkt (110b) des Hochfrequenzfeldkäfigs zu bringen. Über eine Erhöhung der Amplitude der an die Elektroden angelegten Hochfrequenzsignale werden die auf das Teilchen (113) wirkenden elektrischen Polarisationskräfte des Feldkäfigs solange erhöht, bis das Teilchen (113) aus dem Laserfokus (110a) herausgedrückt und in den Fangpunkt (110b) des Hochfrequenzfeldkäfigs gezogen wird. Da die elektrischen Polarisationskräfte auf das Partikel und die Feldverteilung zwischen den Elektroden (11 bis 18) bekannt sind, kann aus der Amplitude der elektrischen Signale zum Zeitpunkt des Positionswechsels auf die optisch induzierten Kräfte geschlossen werden. Durch Wiederholen der Prozedur des „Laser-Trappings“ und der Verschiebung des Partikels (113) in beliebigen Raumrichtungen in oder nahe dem Feldkäfig (111) lassen sich die optisch induzierten Kräfte dreidimensional im optischen Fokalgebiet bestimmen und die Fanggüte des Lasers kalibrieren.

(Figur 1)



Verfahren und Vorrichtung zur Vermessung und Kalibrierung von Laser-Pinzetten

Beschreibung

Die Erfindung betrifft eine Vorrichtung und ein Verfahren zur Vermessung optischer Feldfallen und der Bestimmung von optisch induzierten Kräften in alle drei Raumrichtungen, die auf mikrometergroße Teilchen ausgeübt werden.

Laserfallen, auch „optical tweezers“, „Laser-Pinzetten“ oder „optical traps“ genannt, werden seit etwa zwei Jahrzehnten auf den Gebieten der Biotechnologie, Medizin und Molekularbiologie sowie auf technischem Gebiet zur Positionierung und Manipulation mikrometergroßer und submikrometergroßer Partikeln eingesetzt [Berichte der Bunsen-Gesellschaft für physikalische Chemie, Bd. 93, Nr.3, 1988, „Laser in Life Sciences“; Weber, G. and Greulich, K. O. 1992, Int. Rev. Cytol. 131, 1; Block, S.M. 1990, „Noninvasive Techniques in Cell Biology“, Wiley-Liss. New York, 375]. Die Entwicklung oben genannter „Laser-Tweezer“ geht vor allem auf ASHKIN zurück [Ashkin, A., 1970, Phys. Rev. Lett. 24, 156]. Das Prinzip des Partikel-Trappings beruht darauf, daß neben dem Lichtdruck, der stets ein Teilchen von der Lichtquelle wegdrückt, Gradientenkräfte auftreten, die dazu führen, daß ein Teilchen in den Fokus gelangt bzw. stabil in diesem gehalten wird. Voraussetzung ist, daß die Absorption und Reflexion des Teilchens gering ist, während der Unterschied im Brechungsindex zur Umgebungslösung möglichst groß sein sollte.

Das „optical-trapping“ hat in den letzten Jahren vor allem deshalb eine größere Verbreitung erlangt, weil bei gleicher, stets starker Fokussierung des Lichtstrahls sowohl Teilchen, die größer als die Wellenlänge (sogenannte Mie-Teilchen) als auch Objekte die kleiner als die Wellenlänge sind (sogenannte Rayleigh-Teilchen) gefangen werden können. Das sind vor allem biologische Objekte wie Zellen, Organellen und andere Zellbestandteile als auch große Moleküle (wie DNA) und künstliche Mikropartikeln [Block, S. M. et al., 1990, Nature 348, 348; Bonder, E. M. et al. 1990, J. Cell Biol. 11, 421].

Elektromagnetische Feldkäfige gehen auf den Physiker PAUL [Paul, W. et al., 1958, Forschungsberichte des Wirtschaftsministeriums, Nordrhein-Westfalen Nr.: 415 und 450; Paul, W., 1990, Phys. Blätter 46, 227] zurück. Sie werden vor allem in der Elementarteilchenphy-

sik zum Fangen und Vermessen atomarer Teilchen bei niedrigem Gasdruck verwendet. 1993 wurden erstmals flüssigkeitsgefüllte, dreidimensionale Mikrofeldkäfige unter Nutzung dielektrophoretischer Kräfte vorgestellt [Schnelle et al., 1993, Biochim. Biophys. Acta 1157, 127]. Wird die Leitfähigkeit einer Suspensionslösung höher gewählt, als die mittlere Leitfähigkeit des Teilchens, so sind die im E-Feld induzierten Oberflächenladungen an dem Partikel derart angeordnet und gepolt, daß auf das Partikel abstoßende Kräfte wirken [Fuhr, G. et al., 1994, Biochim. Biophys. Acta 1201, 353]. Auch dieses Prinzip kann zum Fangen, Positionieren und Bewegen von Teilchen benutzt werden [Schnelle et al., 1993, Biochim. Biophys. Acta 1157, 127]. In diesen dielektrischen Feldkäfigen können ebenfalls den Mie- als auch Rayleigh-Teilchen entsprechende Objekte gehalten werden. Eine Kombination beider Prinzipien zum Zwecke einer höheren Fangkraft wurde mehrfach vorgeschlagen, da das optische und das elektrische Kraftfeld nahezu nicht miteinander interferieren [Fuhr, G. and Shirley, S.G. 1998, Topics in Current Chemistry, Vol. 194, 84].

Ein bisher ungelöstes Problem ist die Ermittlung der real im optischen Feld (Lasertrap) auf ein Teilchen wirkenden Kräfte. Hierzu gibt es mehrere, außerordentlich zeit- und geräteaufwendige Methoden, die sich wie folgt zusammenfassen lassen:

Variante I [Svoboda, K. and Block, S. M., 1994, Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struc., 247]: Auf ein im Laserfokus gefangenes Teilchen wirkt eine kalibrierbare Strömung. Gesucht wird die Strömungsgeschwindigkeit, bei der das Teilchen gerade aus dem Laserfokus gerissen wird oder gerade noch in diesem verbleibt. Aus dieser Strömungsgeschwindigkeit kann über die Stokes'sche Reibung eine Fangkraft berechnet werden. Nachteilig an diesem Verfahren ist vor allem, daß es schwer fällt, mit ein und demselben Teilchen wiederholt Messungen auszuführen und, daß nur sehr komplizierte Kanalaufbauten eine Vermessung in verschiedene Raumrichtungen erlauben. Eine wirklich räumliche (x-, y-, z-) Kraftvermessung ist nicht möglich. Dieses Verfahren ist auf bestimmte Teilchenformen (Kugel, Ellipsoid) mit glatter Oberfläche beschränkt.

Variante II [Dennis, C. P., 1990, Faraday Discuss. Chem. Soc. 90, 209]:

Messung der mittleren Auslenkung eines Teilchens im Laserfokus aufgrund der Brown'schen Stöße. Hier ist zwar prinzipiell eine Vermessung in alle Raumrichtungen möglich, sie erfordert jedoch sehr präzise Messung der Partikelbewegung mit Submikrometergenauigkeit und

kann für die meisten Mie-Teilchen nicht verwendet werden, da diese zu groß für eine merkliche Auslenkung sind. Hinzu kommt, daß die Messungen mit steigender Laserleistung immer schwieriger und ungenauer werden.

Variante III [Dennies, C. P. and Walz, J. Y., 1993, Applied Optics, 1629]:

Abreißen eines Teilchens mittels „Laser-Pinzette“, das in definierter Weise an einer Unterlage befestigt ist. Dabei wird die Streuung einer evaneszenten Oberflächenwelle bei Totalreflexion benutzt, um die Bewegung des Objektes in z-Richtung (senkrecht zur Oberfläche) mit einer Genauigkeit im nm-Bereich zu bestimmen. Auch dieses Verfahren kann nicht in alle Raumrichtungen und vor allem nicht rasch angewendet werden, sondern erfordert einen hohen Kalibrier- und Geräteaufwand.

Allgemein steht somit eine schnelle und leicht anzuwendende Methode, die vor allem auch in dem später zu nutzenden Umgebungsmedium, mit eben diesen Teilchen und unter vergleichbaren Bedingungen angewendet werden kann, noch aus.

Gegenüber dem Stand der Technik liegt der Erfindung die Aufgabe zugrunde, eine verbesserte Vorrichtung zur Erfassung optisch induzierter Kräfte und ein entsprechendes Verfahren anzugeben, die sich durch eine erhöhte Meßgeschwindigkeit, bessere Reproduzierbarkeit und Genauigkeit auszeichnen. Die Erfassung der Kräfte soll über ein elektrisches Signal in rasch wiederholbarer und automatisierbarer Form erfolgen, wobei optisch induzierte Kräfte mit einer Genauigkeit im pN-Bereich und darunter in beliebige Raumrichtungen erfaßt werden sollen.

Das wird mit der technischen Lehre der unabhängigen Ansprüche 1, 9 bzw. 18 erreicht. Vorteilhafte Ausführungsformen der Erfindung sind in den abhängigen Ansprüchen angegeben.

Beim „Laser-Trapping“ kann ein Teilchen in einem lokalen Gleichgewicht gehalten werden, das durch eine optische Falle im Fokus mindestens eines Laserstrahls gebildet wird. In einem Hochfrequenz-Mikrofeldkäfig kann ein Teilchen in einem lokalen Gleichgewicht gehalten werden, das durch einen Fangbereich der jeweilig realisierten Feldverteilung gebildet wird. Der Fangbereich kann je nach Feldverteilung durch einen Punkt, eine Linie oder einen Raum-bereich gebildet werden. In der folgenden Beschreibung wird ohne Beschränkung auf die Re-

alisierung des Fangbereiches als Fangpunkt Bezug genommen, die Erfindung kann jedoch entsprechend mit beliebig gebildeten Fangbereichen implementiert werden. Die Erfindung beruht darauf, die optisch induzierten Kräfte in der optischen Falle (optischer Käfig) aus den elektrischen Kräften auf das Teilchen beim Übergang zwischen den Gleichgewichtszuständen, d. h. vom Fokus zum Fangpunkt oder umgekehrt, zu bestimmen. Erfindungsgemäß wird die Aufgabe insbesondere gelöst, indem das „Laser-Trapping“ in einem elektrischen Hochfrequenz- Mikrofeldkäfig erfolgt, dessen Feldkräfte und elektrische Feldverteilung bekannt sind und der zur Einkopplung des zur Bildung des optischen Käfigs erforderlichen Laserlichts eingerichtet ist. Durch Verschieben des im Lasertrap (Fokus) gefangenen Teilchens aus dem Fangpunkt des Feldkäfigs bei niedriger elektrischer Fangleistung in eine definierte Position mit Abstand vom Fangpunkt kann durch nachfolgende Erhöhung der Amplitude der elektrischen Ansteuersignale des Feldkäfigs genau der Schwellenwert bestimmt werden, bei dem die elektrischen Feldkräfte das Teilchen aus dem optischen Fokus zurück zum Fangpunkt bewegen, oder umgekehrt.

Die Einkopplung des zur Bildung des optischen Käfigs erforderlichen Laserlichts wird durch verschiedene bauliche Maßnahmen am Mikrofeldkäfig erzielt. Zu diesen zählt insbesondere die Anbringung mindestens einer Teilgruppe der Elektroden des Mikrofeldkäfigs auf einem Substrat, das transparent und so dünn ist, daß eine Laserlichtquelle genügend dicht an den Mikrofeldkäfig geführt werden kann, daß in diesem der Fokus gebildet wird. Bei praktisch verfügbaren Gestaltungen von Laserpinzetten umfaßt die Laserlichtquelle u. a. ein Einkoppelobjektiv möglichst hoher numerischer Apertur. Dadurch ist die Brennweite üblicherweise im Bereich einiger hundert Mikrometer. Das transparente Substrat besitzt somit vorzugsweise eine Dicke kleiner als die Brennweite der Laserlichtquelle.

Die Erfindung erlaubt je nach Anwendung, die qualitativen und/oder quantitativen Parameter der optisch induzierten Kräfte an einem Teilchen zu erfassen. Die quantitative Bestimmung der optisch induzierten Kräfte kann aus wenigen Größen erfolgen, die z. B. die Orte des Fokus und des Fangpunktes, die Feldverteilung zwischen den Elektroden, die elektrischen Eigenschaften des Teilchens und seiner Umgebungslösungen als auch die Form, Phasenlage, Frequenz und Amplitude aller Elektrodensignale umfassen. Alle diese Größen lassen sich unabhängig von der eigentlichen Messung oder vorab auf rein elektrischem Wege oder über eine einmalige numerische Simulation der Feldverteilung im Hochfrequenzkäfig bestimmen.

Die optisch induzierten Kräfte, die auf das Teilchen wirken, lassen sich aus der Amplitude der elektrischen Ansteuersignale des elektrischen Feldkäfigs beim Übergang zwischen den Gleichgewichten bestimmen. Durch systematisches Verschieben eines in seinen passiven elektrischen Eigenschaften bekannten Partikels in x-, oder/und y-, oder/und z-Richtung können auf diese Weise die Kräfte, die der fokussierte Laserstrahl auf ein Teilchen dieser Größe ausüben kann, quantitativ und orts aufgelöst bestimmt werden.

Ein Vorteil der Erfindung ist es, daß der Kräftegradient der optisch induzierten Kräfte relativ steil ist, so daß der genannte Übergang zwischen den Gleichgewichten schwellwertartig oder sprunghaft erfolgt und somit besonders leicht und genau registriert werden kann.

Erfindungsgemäß kann diese Prozedur automatisiert und zur Kalibrierung des Laserstrahls benutzt werden. Die Messungen lassen sich beliebig oft wiederholen, lassen sich in wenigen Sekunden ausführen und können zudem an ein und demselben Teilchen in der späteren Umgebung durchgeführt werden. Neben Absolutwerten der optisch induzierten Kräfte können Symmetrieabweichungen der optischen Strahlung und deren Intensitätsprofile nahe und im Fokusbereich, d.h. auch relative Werte bestimmt werden.

Die Erfindung ist mit beliebigen Teilchen wie synthetischen Partikeln oder biologischen Zellen oder deren Bestandteilen implementierbar. Die Teilchengröße liegt im gesamten Größenbereich von Teilchen, die mit Laserpinzetten manipulierbar sind, vorzugsweise bei einer Größe kleiner als 200 μm .

Bevorzugte Ausführungsbeispiele der Erfindung werden nachfolgend unter Bezugnahme auf die beiliegenden Figuren näher erläutert. Es zeigen:

Fig. 1: eine Prinzipdarstellung der Anordnung der Feldkäfigelektroden und einer optischen Falle;

Fig. 2: eine weitere Prinzipdarstellung der Anordnung der Feldkäfigelektroden und einer optischen Falle;

Fig. 3: eine Kurvendarstellung zur Illustration experimenteller Ergebnisse;

Fig. 4: beispielhafte Darstellungen der Feldverteilungen eines Oktupol-Feldkäfigs; und

Fig. 5: eine Kurvendarstellung zur Illustration der Fangkräfte des in Figur 4 gezeigten Feldkäfigs in z-Richtung.

Die Erfindung wird im folgenden unter Bezug auf die Kombination eines Oktupol-Feldkäfig mit einem einzelnen Fang-Laserstrahl beschrieben, ist jedoch entsprechend mit beliebigen Feldkäfigformen bzw. mehreren Laserstrahlen realisierbar.

Beispiel 1:

Entsprechend **Figur 1** wird ein elektrischer Hochfrequenzfeldkäfig, bestehend aus den Mikroelektroden (11 bis 18) mit dem fokussierten Lichtstrahl (19) so kombiniert, daß sich der Fokus (110a) im elektrischen Feld der Mikroelektroden, d. h. entweder innerhalb des Feldkäfigraumes (111) oder in unmittelbarer Nähe (112) außerhalb des Käfigs befindet, während der Fangpunkt (110b) des Hochfrequenzfeldkäfigs an einem dazu beabstandeten Ort (z.B. einen Bruchteil bis zu mehrere Partikeldurchmessern entfernt) liegt (z.B. an der Stelle 114, charakterisiert durch die Koordinaten (x_1, y_1, z_1)). Das Verfahren erfolgt beispielsweise derart, daß ein Teilchen (113) im Laserstrahl gefangen und zunächst durch eine Fokusverschiebung in die bezeichnete Position (z.B. 114) gebracht wird. Über eine Erhöhung der Amplitude der an die Elektroden angelegten Hochfrequenzsignale werden die elektrischen Polarisationskräfte des Feldkäfigs solange erhöht, bis das Teilchen (113) aus dem Laserfokus herausgerissen wird und sich in den Fangpunkt (110b) bewegt (Übergang zwischen den lokalen Gleichgewichten).

Der Übergang zwischen den lokalen Gleichgewichten kann alternativ auch ausgeführt werden, indem die Laserleistung erhöht wird und das Teilchen aus dem Fangbereich des Feldkäfigs in den Fokus bewegt wird und/oder indem die Orte der Fangpunkte oder des Fokus verschoben werden und eine Wegbestimmung erfolgt. Da die elektrischen Polarisationskräfte auf das Teilchen und die Feldverteilung zwischen den Elektroden (11-18) bekannt sind, besteht eine direkte Proportionalität zwischen der meßbaren Laserleistung im Fokalbereich, der Amplitude der elektrischen Signale und der auf das Partikel wirkenden optisch induzierten Kräfte. Durch Wiederholen der Prozedur und Verschieben des Teilchens (113) in beliebigen Raumrichtungen, lassen sich die auf das konkrete Teilchen wirkenden optisch induzierten Kräfte quantita-

tiv bestimmen. Es handelt sich dabei folglich um eine elektrische Kalibrierung der optisch induzierte Gegenkräfte, die sehr einfach zu bewerkstelligen ist und es erlaubt, fN bis zu einigen hundert pN zu erfassen.

Beispiel 2:

Figur 2 zeigt die Darstellung eines kompletten Systems zur Vermessung der optisch induzierten Kräfte, die auf ein im Fokus gefangenes Teilchen wirken. Der Mikrofeldkäfig wird durch Mikroelektroden gebildet, die an aufeinander zuweisenden Oberflächen der Substrate 27, 29 angebracht sind. Die Substrate 27, 29 werden durch einen Abstandshalter 28 getrennt, der einen Suspensionsraum bildet, in dem das zu untersuchende Teilchen dem Feld des Mikrofeldkäfigs ausgesetzt wird. Das in **Figur 2** obere Substrat ist genügend dünn, so daß der Fokus des optischen Käfigs in den Suspensionsraum fällt.

Über eine Öffnung (21) werden Zellen oder andere Mikropartikeln suspendiert in einer Lösung in den Kanal (22) eingespült und gelangen dann in den Feldkäfig (23), dessen Ausgangselektroden (24a-d) mit einem Hochfrequenzfeld (kHz- oder MHz-Bereich, beliebige Signalform (z. B. Rechteck-, Sinus-, Dreieck- oder andere Signalformen), Amplitude einige mV bis zu einigen 10 V) beaufschlagt werden. Befindet sich ein Teilchen im Käfig (23), werden die Eingangselektroden (25a-d) zugeschaltet und/oder die Strömung wird gestoppt. Mit dem Laserstrahl (26) wird analog zu Beispiel 1 das Teilchen im Feldkäfigraum bewegt und die Vermessung der optisch induzierten Kräfte vorgenommen. Die für das elektrische Trapping typischen Phasenverschiebungen der Elektrodensignale für zwei mögliche Wechselfeld- und zwei Rotationsfeldansteuerungsarten (2* AC-Feld bzw. 2*Rot-Feld) sind in Tabelle 1 zusammengefaßt.

Feldart	El. 25b	El. 24b	El. 24d	El. 25d	El. 25a	El. 24a	El. 24c	El. 25c
AC-Feld	0°	180°	0°	180°	0°	180°	0°	180°
AC-Feld	0°	180°	0°	180°	180°	0°	180°	0°
Rot-Feld	0°	90°	180°	270°	180°	270°	0°	90°
Rot-Feld	0°	90°	180°	270°	90°	180°	270°	0°

Tabelle 1 Phasensteuerungen der Elektrodensignale eines Oktupols

Beim Rot-Feld wird im Unterschied zum AC-Feld ein Drehmoment auf das Teilchen ausgeübt, das zur Ausbildung einer Rotation (letzte Zeile von Tab.1) führt, die zusätzlich zur Kraft-

bestimmung genutzt werden kann. In der vorletzten Zeile von Tab.1 erfolgt eine Drehmomentkompensation.

Im vorliegenden Beispiel sind die Elektroden in planarer Form auf zwei Glassubstrate (27, 29) mit halbleitertechnologischen Methoden prozessiert worden, die über Kopf durch einen Spacer (28) flüssigkeitsdicht montiert sind, so daß sie in die Kanalflüssigkeit (22) eintauchen. Für eine hohe Laserfokussierung ist es erforderlich, eines der Glassubstrate (hier (27)) möglichst dünn auszuführen. Im vorliegenden Beispiel ist (27) 150 bis 200 μm dick und (29) besteht aus 0.5 bis 1 mm starkem Glas oder Kunststoff.

Beispiel 3:

Bei steigender Laser-Ausgangsleistung wachsen die optisch induzierten Kräfte, so daß zum genannten Übergang zwischen den Gleichgewichten entsprechend steigende elektrische Feldkräfte, d. h. Signalamplituden, erforderlich sind. Dies ist anhand eines experimentellen Ergebnisses in **Figur 3** dargestellt. Deutlich ist zu erkennen, daß die Fangleistung der optischen Falle in z-Richtung schwächer ist (obere Kurve) im Vergleich zur x- und y-Richtung (untere Kurve).

Aus einer Feldverteilung gemäß **Figur 4** (erhalten aus einer einmalig auszuführenden numerischen Berechnung unter Beachtung der realen Elektrodengeometrien gemäß **Figur 1** und Abstände) und den passiven elektrischen Eigenschaften des Testpartikels (in diesem Fall eines Latex-Beads von 8 μm Durchmesser), ergeben sich die in **Figur 5** dargestellten Fangkräfte der Laserpinzette in z-Richtung. Die dargestellte Kurve bezieht sich auf eine Signalamplitude der Käfigelektroden von 10 V. Experimentell konnten Amplituden bis zu 30 V appliziert werden. Bei einer quadratischen Abhängigkeit der Fangkraft des elektrischen Käfigs entspricht das einer maximal erfaßbaren Kraft von ca. 150 pN mit einer Auflösung im pN-Bereich und darunter. Dieses Meßergebnis steht in guter Übereinstimmung mit der Theorie der „Laser-Pinzetten“ (vgl. ASHKIN, A. 1992, Biophys. J. 61, 569). Feiner ausgeführte Elektroden erlauben es, noch weitaus höhere Signalamplituden und damit elektrisch induzierte Kräfte zu erzeugen, so daß auch wesentlich höhere Kräfte erfaßbar sind.

Ein besonderer Vorteil der Erfindung ist es, daß die Methode schnell und leicht insbesondere auch in dem später zu nutzenden Umgebungsmedium, mit den zu untersuchenden oder zu

manipulierenden Teilchen unter vergleichbaren Bedingungen angewendet werden kann. Ferner ist dieses Verfahren nicht auf bestimmte Teilchen- und Oberflächenformen beschränkt, sondern vielmehr mit beliebigen Teilchengemetrien realisierbar. Es können sogar die Kräfte an zusammenhängenden Teilchengruppen (z. B. Aggregate o. dgl.) beliebiger Form bestimmt werden.

11.17.03.99

Verfahren und Vorrichtung zur Vermessung und Kalibrierung von Laser-Pinzetten

Patentansprüche

1. Vorrichtung zur Bestimmung optisch induzierter Kräfte auf Teilchen im Fokus eines optischen Käfigs, **gekennzeichnet durch** eine Mikroelektrodenanordnung mit einem dreidimensionalen elektrischen Feld, in dem sich mindestens der Fokus mit dem Teilchen befindet und das elektrische Feldgradienten aufweist, die einen Fangbereich mit Abstand vom Fokus bilden.
2. Vorrichtung gemäß Anspruch 1, bei der die Mikroelektrodenanordnung planare Elektroden umfaßt, die in Gruppen auf zwei voneinander beabstandeten Substraten angebracht sind, von denen mindestens ein Substrat transparent ist.
3. Vorrichtung gemäß Anspruch 2, bei der das transparente Substrat eine Dicke von weniger als 500 µm besitzt.
4. Vorrichtung gemäß Anspruch 1 oder 2, bei der die Elektroden an aufeinander zuweisenden Oberflächen der Substrate angebracht und die Substrate durch einen Abstandshalter getrennt sind, der einen Suspensionsraum bildet, in den der Fokus durch eines oder beide Substrate eingekoppelt werden kann.
5. Vorrichtung gemäß Anspruch 4, bei der der Suspensionsraum Teil eines Kanals ist, durch den die Teilchen mittels einer Lösungsströmung in das Feld der Mikroelektrodenanordnung führbar sind.
6. Vorrichtung gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, bei der die Mikroelektrodenanordnung eine Vielzahl von Elektroden aufweist, deren Elektrodenenden einen Multipol bilden, der eine in x-, y-Richtung und/oder z-Richtung symmetrische elektrische Feldverteilung besitzt.

7. Vorrichtung gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, bei der die Elektroden mit einer isolierenden dielektrischen Schicht überzogen sind oder aus gegenüber der Lösung im wesentlichen inerten Metallen wie Platin, Titan, Tantal oder Gold bestehen.
8. Vorrichtung gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, bei der die Elektroden mit halbleitertechnologischen Methoden in dreidimensionaler Form oder in Hybridtechnik hergestellt sind.
9. Verfahren zur Bestimmung optisch induzierter Kräfte auf Teilchen im Fokus eines optischen Käfigs mit einer bestimmten Laserleistung, mit den Schritten:
 - a) Positionierung des Fokus in einer Mikroelektrodenanordnung mit einem dreidimensionalen elektrischen Feld, das elektrische, einen Fangbereich bildende Feldgradienten aufweist, mit Abstand vom Fangbereich derart, daß sich das Teilchen entweder im Fokus oder im Fangbereich befindet,
 - b) Variation der Amplitude des elektrischen Feldes, der Laserleistung und/oder des Abstands des Fangbereiches vom Fokus, bis eine Übergangsbewegung des Teilchens vom Fokus zum Fangbereich oder umgekehrt erfolgt, und
 - c) Ermittlung der optisch induzierten Kräfte aus der Amplitude des elektrischen Feldes bei der Übergangsbewegung.
10. Verfahren gemäß Anspruch 9, bei dem die Schritte a) bis c) jeweils für alle interessierenden Raumrichtungen wiederholt werden.
11. Verfahren gemäß Anspruch 9 oder 10, bei dem der Abstand zwischen dem Fokus und dem Fangbereich mindestens ein Zehntel des Teilchendurchmessers beträgt.
12. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 9 bis 11, bei dem die Elektroden der Mikroelektrodenanordnung alternierend mit 180° phasenverschobenen Signalen oder mit rotationserzeugenden Signalen weiterer Phasenaufspaltungen beaufschlagt werden.
13. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 9 bis 12, bei dem der Fangbereich ein Fangpunkt ist und der Fangpunkt innerhalb des Strahlungsfeldes des optischen Käfigs liegt, so daß das Teilchen bei Erniedrigung oder Erhöhung der Amplituden der Elektrodensignale bzw. der

Laserleistung zwischen dem Fangpunkt und dem Fokus hin und her springt und der zugehörige Wert der Amplituden zur Bestimmung der optisch induzierten Kräfte verwendet wird.

14. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 9 bis 12, bei dem der Fangbereich durch mindestens eine Feldbarrieren vom optischen Käfig getrennt ist.

15. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 9 bis 14, bei dem die elektrischen Feldkräfte über die Bewegung des Teilchens zur Justage des optischen Strahles, insbesondere seiner Fanggüte, Symmetrie oder eine andere Kalibrierung des optischen Strahlungsfeldes oder zur Charakterisierung der Teilchen verwendet werden.

16. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 9 bis 15, bei dem die Bewegung des Teilchens und damit die Bestimmung der optischen Kräfte bzw. die Justage der Lichtquelle automatisch erfolgt, in dem die Teilchenbewegung auf optischem Wege oder/und elektrischem Wege detektiert wird.

17. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 9 bis 17, bei dem das Teilchen ein synthetischer Partikel oder eine biologische Zelle oder deren Bestandteil ist, wobei das Teilchen eine Größe kleiner als $200\text{ }\mu\text{m}$ besitzt.

18. Verwendung eines Mikrofeldkäfigs zur Kalibrierung einer Laserpinzette.

M 17-03-99

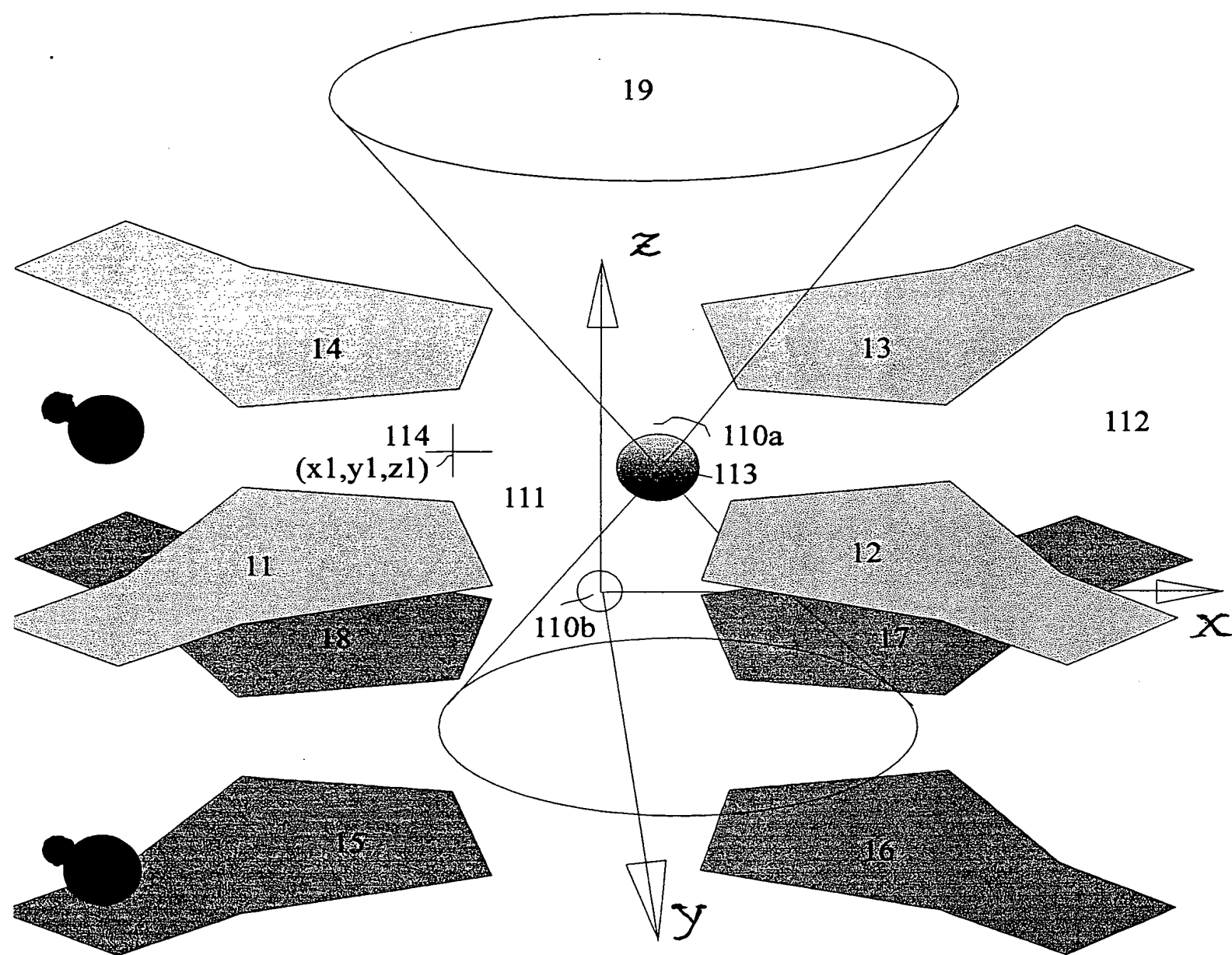


Fig. 1

M 17.03.99

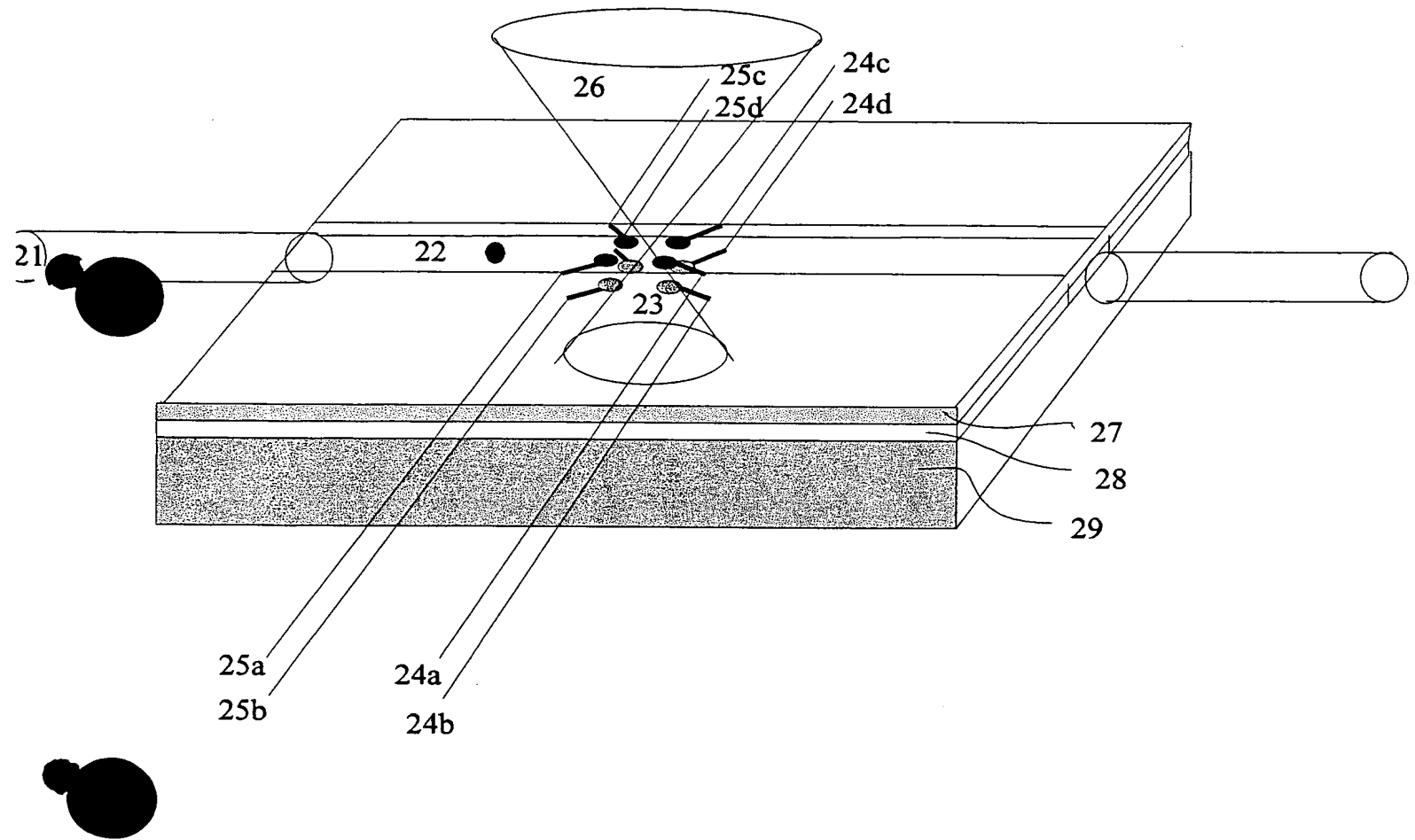


Fig. 2

M 17.03.99

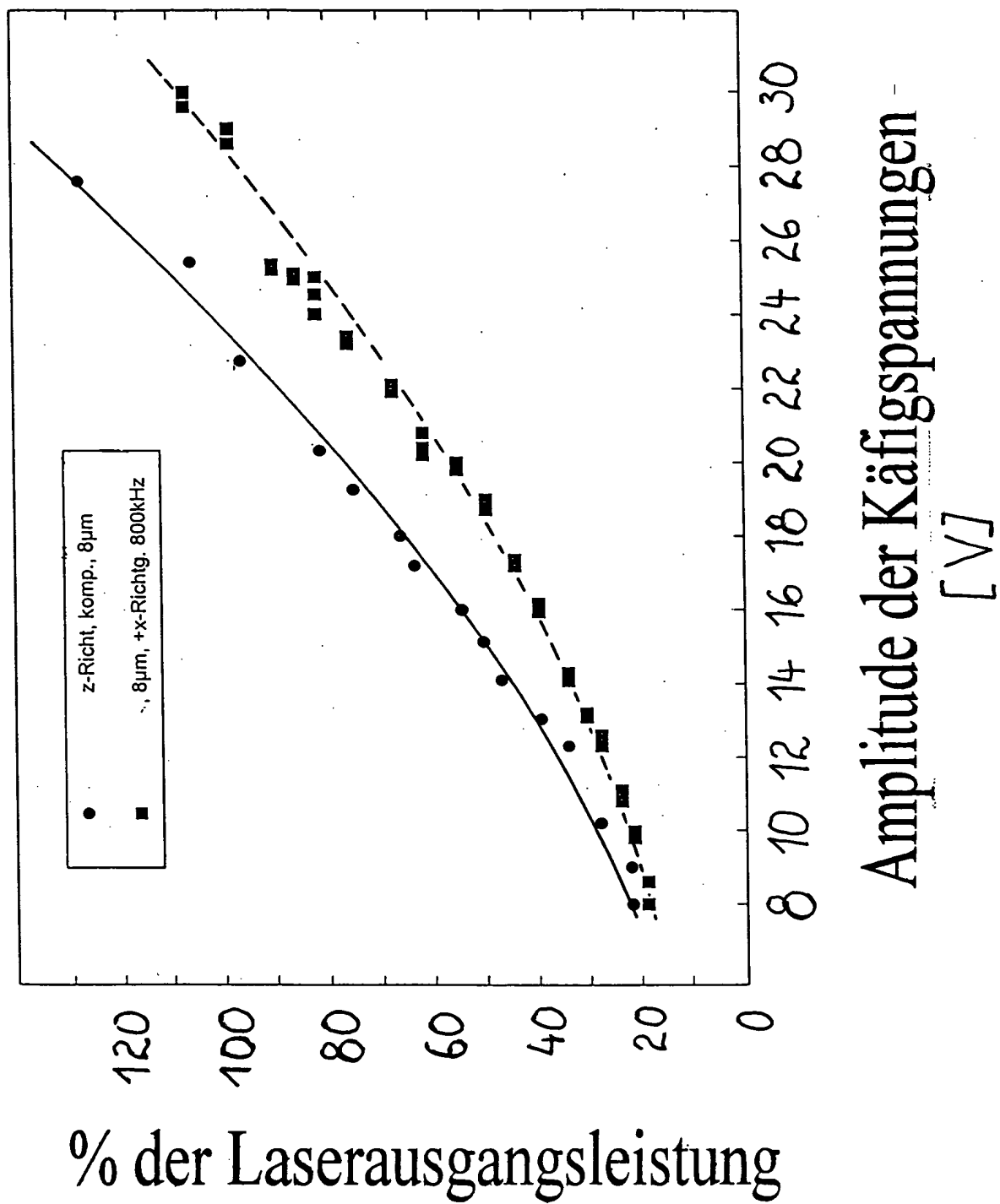
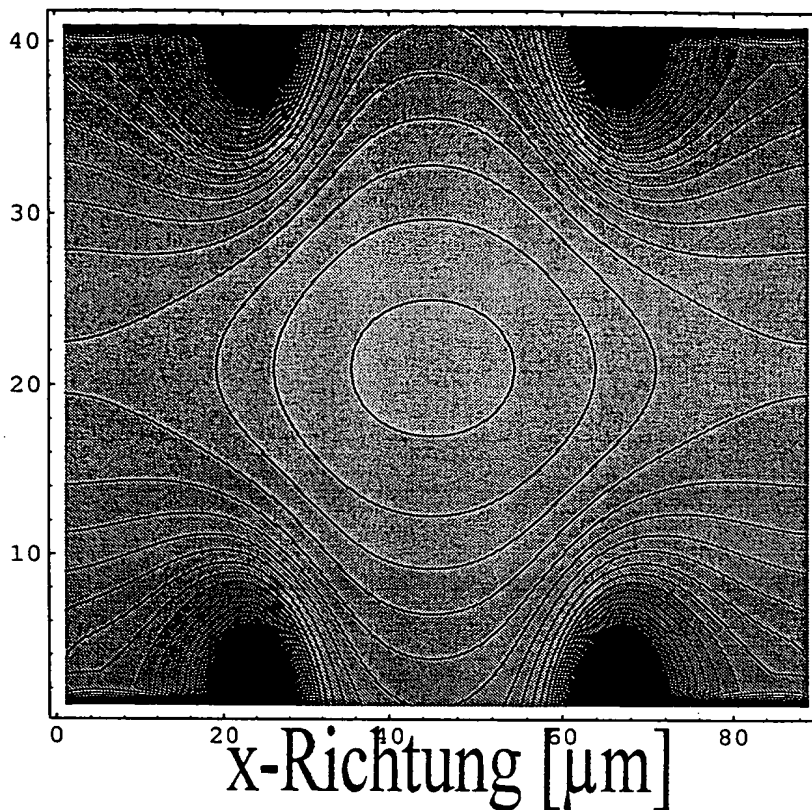


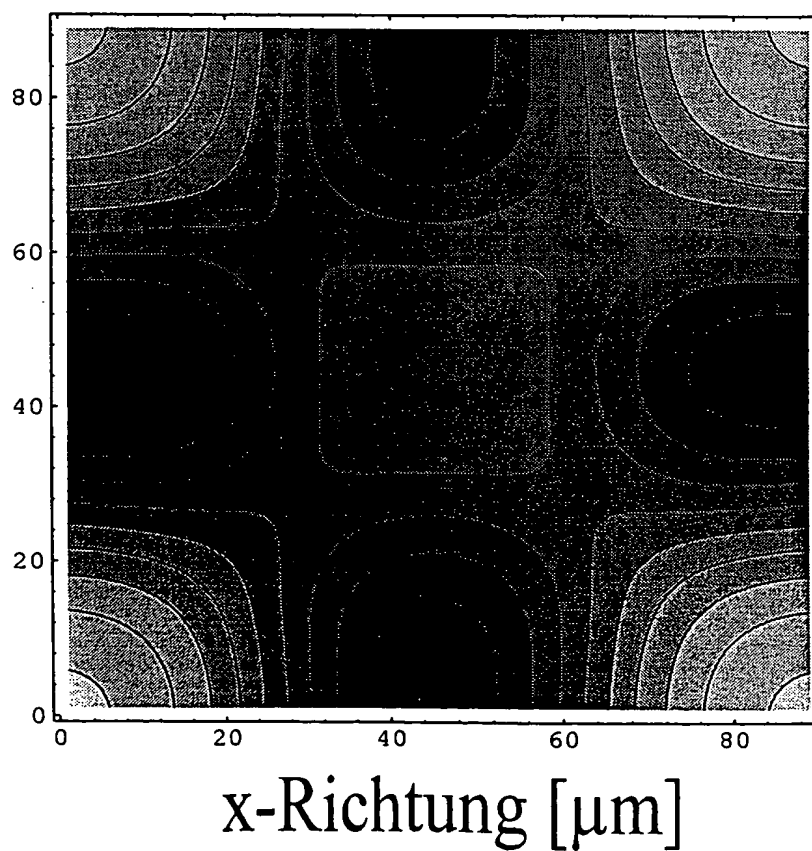
Fig 3

M 17 • Fig. 4

z-Richtung
[μm]



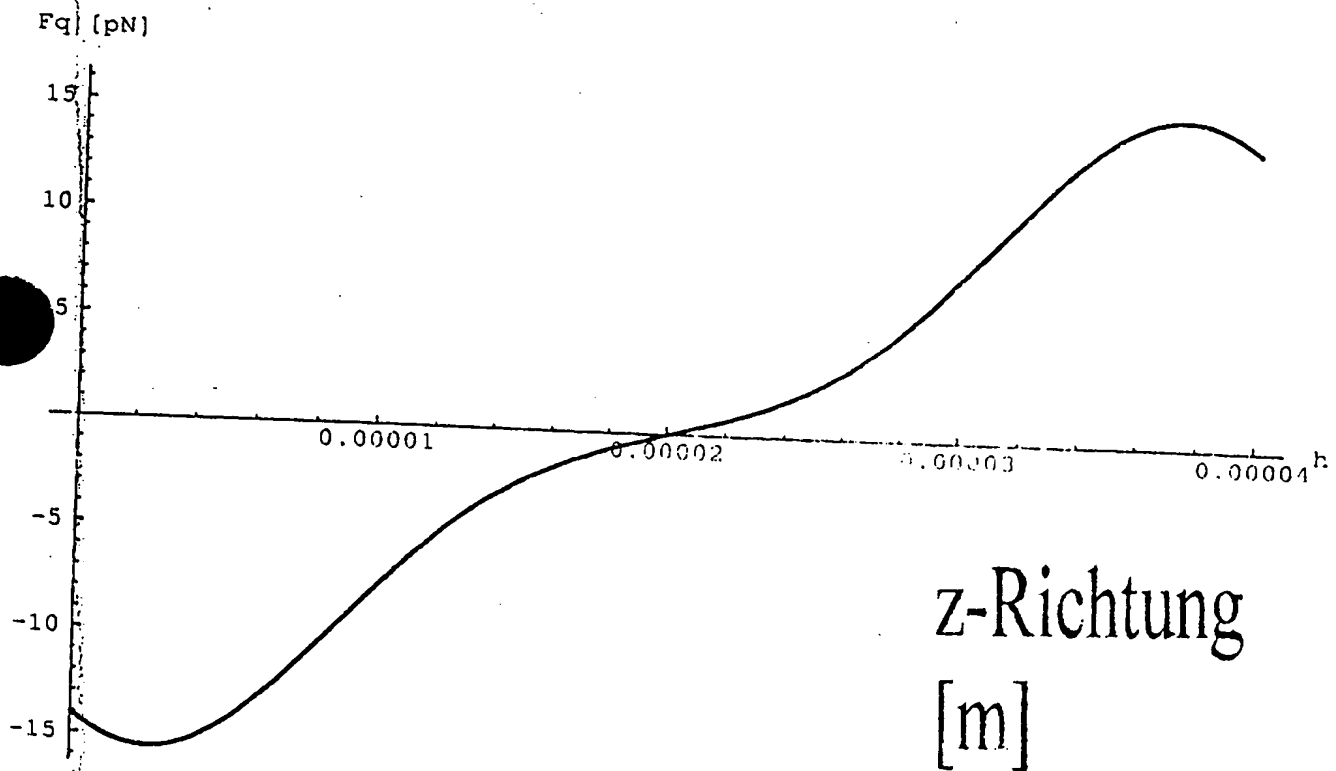
y-Richtung
[μm]



M 17.03.99

Fig. 5

Fangkräfte in [pN]



THIS PAGE BLANK (USPTO)